



АНАЛИЗ РЕГЕНЕРАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА НЕСКОЛЬКИХ СОРТОВ МЯГКОЙ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* L. В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Трушина Н.А., Печёрина А.А., Воденеев В.А., Брилкина А.А.*

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»
Россия, 603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23. *E-mail: annbril@mail.ru

Резюме

Мягкая яровая пшеница является одной из важнейших сельскохозяйственных культур, что обуславливает разработку эффективных подходов к ее культивированию как в полевых условиях, так и *in vitro*. При этом размножение пшеницы в условиях *in vitro* сопряжено со стадией формирования каллуса и дальнейшей его регенерации в целые растения. Однако не все сорта пшеницы способны к формированию морфогенного каллуса и регенерации *in vitro*. В данной работе на регенерационную способность было исследовано 5 сортов мягкой яровой пшеницы: Ирень 2, Нарру (Хэппи), Новосибирская 16, Злата, Дарья, а также оценено влияние интенсивности освещения на активность их органогенеза. Для индукции каллусогенеза использовали синтетический ауксин 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) в различных концентрациях: 0,5 мг/л для питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) с солями L7 (MCL7), а также 2,5 мг/л для сред МС и MCL7. Способность к регенерации побегов у каллусов анализировали на безгормональных питательных средах МС и L7, при различных вариантах освещения: 90 или 120 мкмоль/м²с. Выявлено, что для эффективной индукции морфогенных каллусов из зрелых зародышей, используемых нами сортов мягкой яровой пшеницы, целесообразно использовать питательную среду MCL7 в присутствии 0,5 или 2,5 мг/л 2,4-Д. Наиболее перспективными и обладающими наибольшим регенерационным потенциалом из исследуемых нами сортов являются сорта мягкой яровой пшеницы Ирень 2 и Нарру.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, сортоспецифичность, каллусогенез, регенерация, питательная среда, ауксины, интенсивность освещения

Цитирование: Трушина Н.А., Печёрина А.А., Воденеев В.А., Брилкина А.А. Анализ регенерационного потенциала нескольких сортов мягкой яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. в культуре *in vitro* // *Biomics*. 2023. Т.15(4). С.263-271. DOI: 10.31301/2221-6197.bmes.2023-23

© Авторы

ANALYSIS OF THE REGENERATION POTENTIAL OF SEVERAL VARIETIES OF BREAD SPRING WHEAT *TRITICUM AESTIVUM* L. IN *VITRO* CULTURE

Trushina N.A., Pecherina A.A., Vodeneev V.A., Brilkina A.A.*

Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod (UNN)
Russia, 603022, Nizhny Novgorod, Gagarin Ave., 23. *E-mail: annbril@mail.ru

Resume

Bread spring wheat is one of the most important crops, which leads to the development of effective approaches to its cultivation both in the field and *in vitro*. At the same time, wheat reproduction *in vitro* is associated with the stage of callus formation and its further regeneration. However, not all wheat varieties are capable of morphogenic callus formation and *in vitro* regeneration. In this work, 5 varieties of bread spring wheat were studied for regenerative ability: Iren 2, Happy, Novosibirskaya 16, Zlata, Daria, and the effect of lighting intensity on the activity of their organogenesis was estimated. To induce callus, synthetic auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) was used in various concentrations: 0.5 mg/l for Murashige and Skoog nutrient medium (MS) with L7 salts (MSL7), as well as

2.5 mg/l for MS and MSL7 media. The ability to regenerate shoots in calli was analyzed on hormone-free nutrient media MS and L7, with various lighting options: 90 or 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{c}$. It was revealed that for the effective induction of morphogenic calluses from mature embryos of the varieties of bread spring wheat used by us, it is advisable to use the MSL7 nutrient medium in the presence of 0.5 or 2.5 mg/l 2,4-D. The most promising and having the greatest regenerative potential of the varieties studied by us are the varieties of bread spring wheat Iren 2 and Happy.

Keywords: *Triticum aestivum*, variety specificity, callusogenesis, regeneration, nutrient medium, auxins, lighting intensity

Citation: Trushina N.A., Pecherina A.A., Vodeneev V.A., Brilkina A.A. Analysis of the regeneration potential of several varieties of bread spring wheat *Triticum aestivum* L. *in vitro* culture. *Biomcs*. 2023. T.15(4). С. 263-271. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-23 (In Russian)

© The Authors

Введение

Пшеница входит в число важнейших сельскохозяйственных культур. Согласно оценкам, урожай пшеницы удовлетворяет до 21% от общего количества калорий и 20% потребностей в белке населения Земли [Aadel et al., 2018]. В связи с высокой значимостью этой культуры усилия селекционеров направлены на получение новых сортов, обладающих с одной стороны высокой урожайностью, а с другой – устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессорам. Задача минимизации потерь урожая, связанных с наступлением неблагоприятных погодных условий, становится более актуальной и в связи с глобальными климатическими изменениями [Anders et al., 2021].

Выявление в ходе селекции генотипов, обладающих устойчивостью к определенному стрессору, базируется на поиске генетических маркеров, связанных с проявлением этой устойчивости, а также проведении испытаний в лабораторных и полевых условиях [Salgotra, Stewart, 2020]. Результативность таких работ, повышается в том случае, если известны молекулярно-физиологические механизмы формирования защитных реакций растений на действие определенного стрессора. Особое внимание исследователи уделяют сигнальным системам, их механизмам функционирования и роли в формировании устойчивости [Sewelam et al., 2016; Dingetal., 2022]. Эффективным инструментом в расшифровке механизмов внутриклеточной и межклеточной сигнализации растений являются модельные растения, экспрессирующие генетически-кодированные флуоресцентные сенсоры сигнальных молекул [Sadoine et al., 2021].

На сегодняшний день получен целый ряд модельных организмов с флуоресцентными сенсорами к таким сигнальным молекулам как Ca^{2+} , H^+ , H_2O_2 . При этом большинство работ выполнено на арабидопсисе [Zhu et al., 2014; Ageyeva et al., 2022; Nietzel et al., 2019; Shi et al., 2021], табаке [Pecherina et al., 2023; Ageyeva et al., 2023], картофеле [Pecherina et al., 2023]. С их

помощью уже получены важные сведения о механизмах стрессовых реакций при действии широкого круга неблагоприятных факторов, включая засоление [Pecherina et al., 2023; Ageyeva et al., 2023], пониженную и повышенную температуру [Pecherina et al., 2021], атаку патогенов [Yan et al., 2022].

Несмотря на высокую эффективность использования экспрессирующих флуоресцентные сенсоры модельных организмов, подавляющее число работ выполнено на двудольных растениях. Учитывая существующие факты различия в ответе однодольных и двудольных растений на неблагоприятные факторы среды, не всегда можно переносить механизмы, полученные на двудольных растениях на однодольные [Ruts et al., 2012; Matkowski, Daszkowska-Golec, 2023]. Поэтому создание однодольных модельных растений, в том числе пшеницы – важная задача физиологии растений. Отсутствие модельных однодольных растений с генетически кодируемыми сенсорными белками во многом объясняется сложностями с генетической трансформацией злаков, поскольку наиболее распространенным методом служит агробактериальная трансформация, которая является естественным природным процессом у двудольных растений. Кроме того, чаще всего генетическая трансформация растений проходит через стадию культуры *in vitro*, которая для однодольных растений сопряжена со значительными трудностями и во многом зависит от видовых и сортовых особенностей растения [Hensel, 2020]. Важнейшей стадией трансформации пшеницы является стадия формирования морфогенных каллусов для дальнейшего получения растений-регенерантов. При этом известно, что не все сорта пшеницы в том числе мягкой (*Triticum aestivum* L.) способны к формированию морфогенного каллуса и регенерации *in vitro* [Мирошниченко и др. (Miroshnichenko et al.), 2014; Кулуев и др. (Kuluyev et al.), 2022; Гумерова и др. (Gumerova et al.), 2023]. Поэтому для успешной трансформации пшеницы необходимо подбирать генотип (сорт), способный к регенерации, а также условия культивирования, способствующие этому

процессу. С этой целью мы использовали несколько сортов мягкой яровой пшеницы, которые акклиматизированы и выращиваются в Волго-Вятском регионе России, для анализа их регенерационной способности и подбора условий для получения морфогенных каллусов и их регенерантов.

Материалы и методы

В работе использовали мягкую яровую пшеницу (*T. aestivum* L.) пяти сортов: Дарья, Злата, Ирень 2, Новосибирская 16 и Нарру (Хэппи), полученных нами из АО Агрофирма «Сергеевское» (Большеболдинский район Нижегородской области). В качестве эксплантов для индукции каллуса использовали зрелые зародыши пшеницы.

Семена пшеницы стерилизовали в растворах: 80% этанол – 1 минута, 10% гипохлорит натрия – 5 минут, 10% H₂O₂ – 5 минут, после чего промывали в стерильной дистиллированной воде 4 раза по 10 минут.

Были использованы питательные среды двух составов: среда, содержащая макро- и микросоли и витамины по прописи Мурасиге-Скуга (МС) [Murashige, Skoog, 1962] и среда, в которой микросоли МС были заменены на микросоли L7 (MCL7), а также дополнительно содержащая 18,75 г/л L-глутамин, 3,75 г/л L-пролин и 2,5 г/л L-аспарагин [Spark, Jones, 2009]. Для индукции каллусогенеза использовали синтетический ауксин 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) в различных концентрациях: 0,5 мг/л для среды МС с солями L7, а также 2,5 мг/л для обоих вариантов сред.

Из простерилизованных семян в ламинарном боксе извлекали зародыши и по 15 штук помещали на питательную среду в чашки Петри (диаметр 9 см).

Каллусогенез проводили в темноте при температуре 25°C до появления каллусов в течение 2 недель (среда МС с 2,5 мг/л 2,4-Д) или 4-7 дней (среды MCL7 с 0,5 или 2,5 мг/л 2,4-Д).

Для анализа способности к регенерации побегов сформировавшиеся каллусы переносили на безгормональные среды МС или L7, в которой макро- и микросоли МС полностью заменены на соли L7, а также были использованы витамины L7 [Spark, Jones, 2009]. Культивирование осуществляли при температуре 26°C и фотопериоде 16/8 свет/темнота при разных вариантах освещения: 90 или 120 мкМоль/м²с (с использованием люминесцентных ламп теплого белого цвета (OSRAM, Германия) в течение 2 недель. Развившиеся регенеранты пшеницы, имеющие побег и корни, пересаживали в стеклянные банки со свежей питательной средой МС или L7 для дальнейшего культивирования.

Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях. Интенсивность каллусообразования и регенерации выражали в процентах. В качестве погрешности представлено среднеквадратичное отклонение среднего.

Результаты и обсуждение

В данной работе была использована среда МС, а также среда MCL7 с добавлением синтетического ауксина 2,4-Д, выступающего в качестве индуктора деления клеток. На первом этапе были проведены эксперименты по подбору питательной среды и оптимальной концентрации 2,4-Д для индукции каллусогенеза мягкой яровой пшеницы различных сортов (табл. 1).

Таблица 1

Эффективность каллусогенеза у зрелых зародышей мягкой яровой пшеницы в зависимости от состава питательных сред и концентрации 2,4-Д

Table 1 – The effectiveness of callus induction in mature embryos of bread spring wheat, depending on the composition of nutrient media and concentration of 2,4-D

Сорта мягкой яровой пшеницы Varieties of bread spring wheat	Количество каллусов, % / Quantity of calluses, %		
	Питательная среда с добавлением 2,4-Д / Nutrient medium with the addition of 2,4-D		
	Среда МС 2,5 мг/л 2,4-Д Medium of MS 2,5 mg/L 2,4-D	Среда MCL7 2,5 мг/л 2,4-Д Medium of MS 2,5 mg/L 2,4-D	Среда MCL7 0,5 мг/л 2,4-Д Medium of MS 0,5 mg/L 2,4-D
Ирень 2 Irene 2	55±0,03	97±0,05	97±0,05
Нарру	64±0,09	86±0,08	92±0,11
Новосибирская 16 Novosibirskaya 16	44±0,05	94±0,04	85±0,03
Злата Zlata	44±0,09	68±0,31	70±0,09
Дарья Daria	62±0,21	84±0,05	75±0,07

Формирование каллусов на средах с разным составом происходило в разные сроки: на среде МС с 2,5 мг/л 2,4-Д – в течение 2 недель, на среде МСL7 с обоими вариантами содержания 2,4-Д значительно раньше – через 4-7 дней. Интенсивность каллусообразования была также меньше на среде МС. Худшую способность к индукции каллусов на данной среде среди испытываемых сортов показывали сорта Злата (44±0,05%) и Новосибирская 16 (44±0,05%). Несколько выше процент каллусообразования

выявлен для таких сортов, как Нарру (64±0,09%) и Дарья (62±0,21%). Кроме того, каллусы всех 5 сортов мягкой яровой пшеницы на среде МС имели рыхлую обводненную структуру (рис. 1А, Б, В). Исходя из этого, можно сделать вывод, что питательная среда МС с добавлением 2,5 мг/л 2,4-Д, не подходит для образования морфогенных каллусов используемых нами сортов мягкой яровой пшеницы и их дальнейшей регенерации.

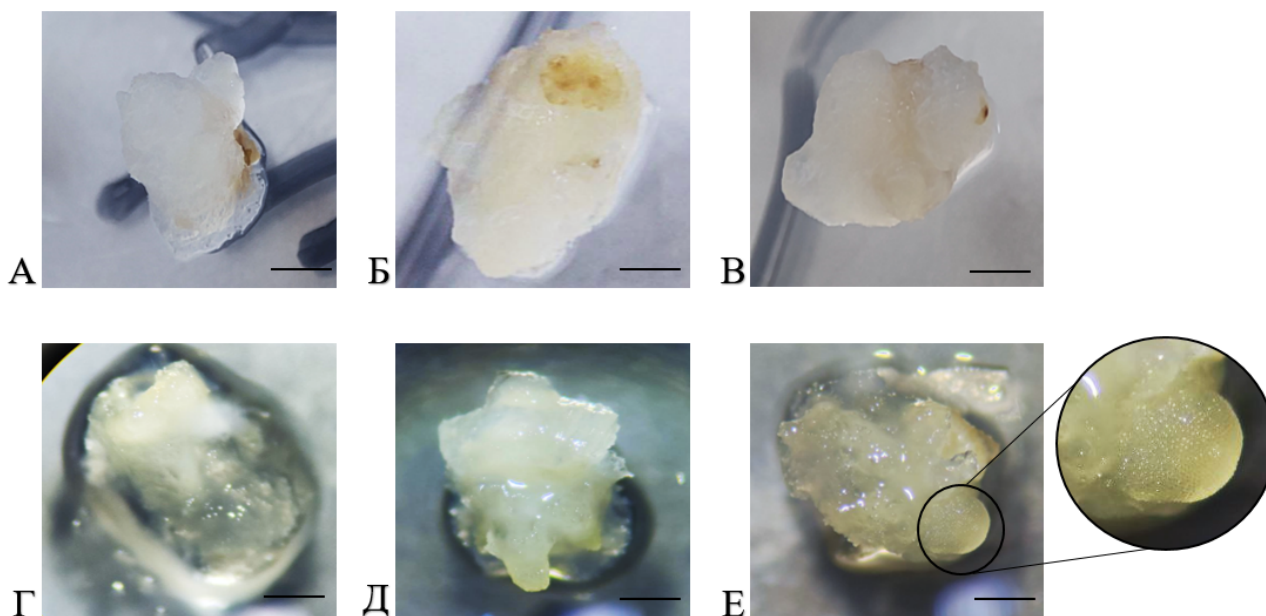


Рис. 1. Формирование каллусов из зрелых зародышей мягкой яровой пшеницы на питательных средах МС с 2,5 мг/л 2,4-Д (А – Злата, Б – Нарру, В – Ирень 2) и МСL7 с 0,5 мг/л 2,4-Д (Г – Дарья, Д – Нарру, Е – Ирень 2)
Fig. 1. Formation of calluses from mature embryos of bread spring wheat on nutrient media MS with 2.5 mg/l 2,4-D (A – Zlata, B – Narru, C – Iren 2) and MSL7 with 0.5 mg/l 2,4-D (D – Daria, D – Narru, E – Iren 2)

Использование среды МСL7 с добавлением 2,4-Д в концентрациях 0,5 и 2,5 мг/л увеличивало эффективность каллусогенеза. Наибольшее количество каллусов (97±0,05%) было получено из зародышей сорта Ирень 2 (в присутствии 2,4-Д обеих концентраций) и из зародышей пшеницы сорта Нарру на среде с добавлением 0,5 мг/л 2,4-Д (92±0,11%) (табл. 1). Сорт Новосибирская 16 также показал хорошую способность к индукции каллусов при добавлении в питательную среду 2,5 мг/л 2,4-Д. Наименьшее количество каллусов было обнаружено у сорта Злата: 68±0,31% при добавлении в среду МСL7 2,5 мг/л 2,4-Д и 70±0,09% при 0,5 мг/л. Каллусы, формирующиеся на питательной среде МСL7, были

более плотные и формировали морфогенные очаги (рис.1 Г, Д, Е). Таким образом, для эффективной индукции каллусов из зародышей используемых нами сортов мягкой яровой пшеницы целесообразно использовать питательную среду МСL7 в присутствии 0,5 или 2,5 мг/л 2,4-Д.

Следующий этап при культивировании пшеницы *in vitro* – это дифференциация клеток в целые органы. В данной работе были использованы питательные среды МС и L7 без использования фитогормонов. На этом этапе были проведены эксперименты по подбору питательной среды, а также условий освещения для регенерации различных сортов мягкой яровой пшеницы (табл. 2).

Эффективность регенерации каллусов, полученных из зрелых зародышей мягкой яровой пшеницы разных сортов, в зависимости от состава питательных сред и интенсивности освещения

Table 2 – The efficiency of regeneration of calluses obtained from mature embryos of bread spring wheat of different varieties, depending on the composition of nutrient media and the intensity of illumination

Сорта мягкой яровой пшеницы Varieties of bread spring wheat	Количество регенерантов, % / Number of regenerants, %				
	Питательная среда / Nutrient medium				
	МС (после 2,5 мг/ 2,4-Д) MS (after 2,5 mg/ 2,4-D) 90 мкмоль/м ² с μmol/m ² s	L7 (после 2,5 мг/ 2,4-Д) L7 (after 2,5 mg/ 2,4-D)		L7 (после 0,5 мг/ 2,4-Д) L7 (after 0,5 mg/ 2,4-D)	
		90 мкмоль/м ² с μmol/m ² s	120 мкмоль/м ² с μmol/m ² s	90 мкмоль/м ² с μmol/m ² s	120 мкмоль/м ² с μmol/m ² s
Ирень 2 Irene 2	0	6±0,02	7±0,09	21±0,11	16±0,12
Нарру	3±0,1	17±0,13	13±0,18	37±0,24	27±0,28
Новосибирская 16 Novosibirskaya 16	10±0,1	17±0,23	15±0,21	14±0,1	0
Злата Zlata	7±0,1	32±0,1	11±0,15	4±0,1	0
Дарья Daria	0	12±0,16	20±0,28	4±0,1	0

Образование побегов наблюдали спустя неделю культивирования как на питательной среде МС, так и L7. При этом на среде МС интенсивность образования побегов была меньше, и худшую способность к регенерации на этой среде наблюдали у сортов Ирень 2 и Дарья (0%), а также у сорта Нарру

(3%). Несколько выше значения были получены для таких сортов, как Новосибирская 16 (10%) и Злата (7%). Следовательно, использование среды МС для получения регенерантов используемых нами сортов пшеницы не целесообразно.

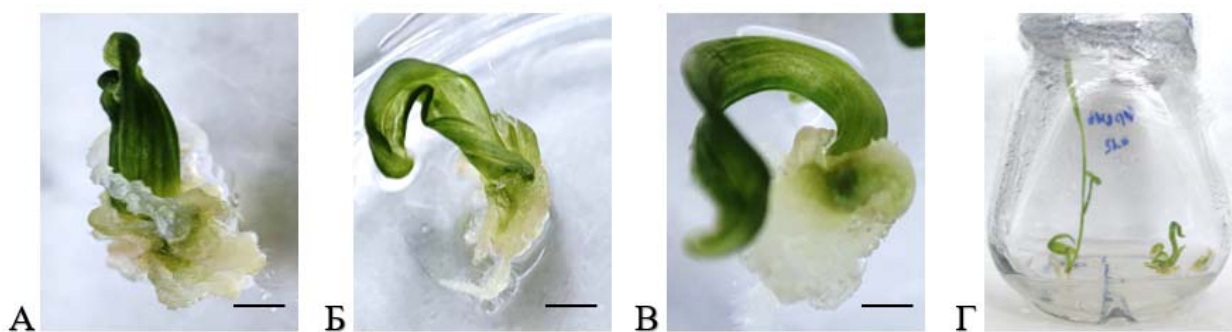


Рис. 2. Формирование побегов на среде L7 в каллусах, сформированных на питательной среде (MSL7 с 0,5 мг/2,4-Д) и режиме освещения 120 мкмоль/м²с различных сортов пшеницы: спустя неделю культивирования (А – Ирень 2, Б – Нарру, В – Злата) и 2 недели культивирования (Г)

Fig. 2. Formation of shoots on medium L7 in calluses formed on nutrient medium (MSL7 with 0,5 mg/ 2,4-D) and lighting mode 120 μmol/m²s of various wheat varieties: after a week of cultivation (A – Iren 2, B – Happy, C – Zlata) and 2 weeks of cultivation (D)

Использование среды L7 увеличивало эффективность регенерации, при этом эффект зависел как от используемого сорта пшеницы, содержания 2,4-Д в среде для каллусогенеза, так и от интенсивности освещения. В большинстве случаев регенерация каллусов, находящихся под более интенсивным освещением, происходила менее активно.

Для сортов Ирень2 и Нарру активнее всего регенерация каллусов происходила при пересадке со среды для каллусообразования MCL7 с 0,5 мг/л 2,4-Д ($37 \pm 0,24\%$ и $21 \pm 0,11\%$ соответственно). Для сортов Новосибирская 16 и Злата регенеранты лучше образовывались из каллусов, полученных на MCL7 с 2,5 мг/л 2,4-Д ($17 \pm 0,23\%$ и $32 \pm 0,1\%$ соответственно). Регенерация побегов пшеницы сорта Дарья эффективнее происходила из каллусов, полученных на среде MCL7 с 2,5 мг/л 2,4-Д ($20 \pm 0,28\%$) при более интенсивном освещении, чем в случае других сортов (табл. 2).

Таким образом, нами проведен анализ способности образовывать морфогенные каллусы, способные к регенерации *in vitro* пяти сортов мягкой яровой пшеницы. Данные сорта пшеницы отличаются по устойчивости к засухе и тепловому стрессу и обладают разной способностью к накоплению биомассы при действии этих неблагоприятных факторов [Шерстнева и др. (Sherstneva et al.), 2021]. Пшеница, как и все злаки, относится к группе гормонзависимых объектов культивирования *in vitro*. При изолировании зародыша пшеницы из зерновок и помещении его на питательную среду, содержащую ауксин, происходит нарушение упорядоченности делений, ингибируется апикальное доминирование и формируется каллусная культура [Хлебова и др. (Khlebova et al.), 2016]. Подбор оптимальной концентрации ауксинов для каждого используемого сорта – один из ключевых этапов в работе с такой культурой [Сельдимирова и др. (Seldimirova et al.), 2007]. Наиболее активным ауксином в отношении каллусообразования является 2,4-Д. Во многих исследованиях для различных сортов пшеницы показано, что эффективные концентрации этого гормона для получения желтого компактного каллуса, способного к дальнейшей регенерации, находятся в диапазоне 0,5–2,5 мг/л. Наиболее часто используются концентрации 2 мг/л [Mitić et al., 2014] и 2,5 мг/л [Medvecka, Harwood, 2014]. При этом в работе Mokhtari и др. [2013] показано, что более низкие концентрации 2,4-Д приводят к образованию множественных побегов. С увеличением концентрации 2,4-Д до 2 мг/л увеличивалось каллусообразование и уменьшалась регенерация побегов.

Кроме ауксинов на формирование морфогенных каллусов, способных к регенерации,

влияет и минеральный состав питательной среды. С.А. Spark и Н.Д. Jones [2009] активировали индукцию каллусов пшеницы на среде, в которой микросоли МС были заменены на микросоли L7, с добавлением 0,5 мг/л 2,4-Д. Полученные нами результаты также показали, что использование данной среды с добавлением 0,5 мг/л 2,4-Д увеличивало эффективность каллусогенеза на различных сортах мягкой яровой пшеницы. На среде L7, с добавлением 0,5 или 2,5 мг/л 2,4-Д формировались более плотные желтые каллусы с морфогенными очагами, в то время как на среде МС каллусы чаще всего были практически бесцветные, состоящие из сильно обводненных прозрачных клеток. Такие каллусы не обладают регенерационным потенциалом [Мирошниченко и др. (Miroshnichenko et al.), 2014]. При этом все изучаемые нами сорта пшеницы продемонстрировали способность к каллусообразованию в пределах от 44% до 97% от первоначального числа эксплантов. Максимальную регенерационную активность (до 37% от числа полученных каллусов) проявляли каллусы сорта Нарру, перенесенные на безгормональную среду. Предполагается, что в формирующихся морфогенных очагах, индуцированных ауксином при каллусообразовании активируется синтез собственных гормонов экспланта, способствующих регенерации и формированию целого растения [Круглова и др. (Kruglova et al.), 2020; Сельдимирова и др. (Seldimirova et al.), 2018].

В целом можно отметить, что наиболее перспективными и обладающими наибольшим регенерационным потенциалом из исследуемых нами сортов являются сорта мягкой яровой пшеницы Ирень 2 и Нарру. В дальнейшем для этих сортов нами будут улучшены методы получения регенерантов и разработаны протоколы генетической трансформации для получения модельных растений с генетически кодируемыми сенсорами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075-15-2021-1066.

Литература

1. Гумерова Г.Р., Галимова А.А., Кулуев Б.Р. Каллусообразование и органогенез мягкой пшеницы с использованием зрелых зародышей в качестве эксплантов // *Труды по Прикладной Ботанике, Генетике и Селекции*. 2023. Т. 184(2). С. 19–28. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-19-28
2. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Система «Зародыш *in planta*–каллус *in vitro*»: цитофизиологические аспекты (на примере пшеницы)

- // *Биомика*. 2020. Т.12(2). С. 180-189. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-8
3. Кулуев Б.Р., Михайлова Е.В., Кулуев А.Р., Галимова А.А., Заикина Е.А., Хлесткина Е.К. Редактирование геномов представителей трибы пшеницевые с использованием системы CRISPR/Cas // *Молекулярная биология*. 2022. Т. 56(6). С. 949-968. DOI: 10.31857/S0026898422060155
 4. Мирошниченко Д.Н., Соколов Р.Н., Аликина О.В., Долгов С.В. Скрининг регенерационного потенциала ди-, тетра- и гексаплоидных сортов и видов пшеницы в культуре *in vitro* // *Биотехнология*. 2014. Т. 30(1). С. 38–51.
 5. Сельдимирова О.А., Галин И.Р., Круглова Н.Н., Веселов Д.С. Эмбриодогенная способность каллусов пшеницы и ячменя *in vitro* определяется балансом содержания эндогенных фитогормонов // *Биомика*. 2018. Т. 10(4). С. 381-386. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-49
 6. Aadel H., Abdelwahd R., Udupa S.M., Diria G., Mouhtadi A. El, Ahansal K., Gaboun F., Douira A., Iraqi D. *Agrobacterium*-mediated Transformation of Mature Embryo Tissues of Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes // *Cereal Research Communications*. 2018. V. 46(1). P. 10-20. doi: 10.1556/0806.45.2017.055
 7. Ageyeva M., Veselov A., Vodeneev V., Brilkina A. Cell-Type-Specific Length and Cytosolic pH Response of Superficial Cells of Arabidopsis Root to Chronic Salinity // *Plants*. 2022. V. 11(24). 3532. doi: 10.3390/plants11243532
 8. Ageyeva M.N., Zdobnova T.A., Nazarova M.S., Raldugina G.N., Beliaev D.V., Vodeneev V.A., Brilkina A.A. The Morphological Parameters and Cytosolic pH of Cells of Root Zones in Tobacco Plants (*Nicotiana tabacum* L.): Nonlinear Effects of NaCl Concentrations // *Plants*. 2023. V. 12(21). 3708. doi: 10.3390/plants12213708
 9. Anders S., Cowling W., Pareek A., Gupta K. J., Singla-Pareek S. L., Foyer C. H. Gaining Acceptance of Novel Plant Breeding Technologies // *Trends in Plant Science*. 2021. V. 26(6). P. 575-587. doi: 10.1016/j.tplants.2021.03.004
 10. Ding L.N., Li Y.T., Wu Y.Z., Li T., Geng R., Cao J., Zhang W., Tan X.L. Plant Disease Resistance-Related Signaling Pathways: Recent Progress and Future Prospects // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23(24). 16200. doi: 10.3390/ijms23241620
 11. Hensel G. Genetic transformation of Triticeae cereals - Summary of almost three-decade's development // *Biotechnol Adv.* 2020. V. 40. 107484. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.107484
 12. Matkowski H., Daszkowska-Golec A. Update on stomata development and action under abiotic stress // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 14. 1270180. doi: 10.3389/fpls.2023.1270180
 13. Medvecka E., Harwood W.A. Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using mature embryos. *Agrobacterium protocols* // *New York: Springer*. 2015. V.1223. P. 199-209. doi: 10.1007/978-1-4939-1695-5_16
 14. Mitić N., Vinterhalter B., Ninkovic S., Dodig D. The procedure providing enhanced *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat // *Biologia*. 2015. V. 69(12). P. 1668-1677. doi: 10.2478/s11756-014-0477-2
 15. Mokhtari A., Alizadeh H., Samadi B.Y., Omidi M., Otrushy M., Moeini Z. Effect of plant growth regulator on direct shoot regeneration of wheat immature embryonic explants // *Eng. Biotech.* 2013. V. 1(3). P. 74-80. doi: 10.18005/JAEB0103004
 16. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assay with Tobacco Tissue Cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. V. 15(3). P. 473-497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
 17. Nietzel T., Elsasser M., Ruberti C., Steinbeck J., Ugalde J. M., Fuchs P., Wagner S., Ostermann L., Moseler A., Lemke P., Fricker M. D., Muller-Schussele S. J., Moerschbacher B. M., Costa A., Meyer A. J., Schwarzlander M. The fluorescent protein sensor roGFP2-Orp1 monitors *in vivo* H₂O₂ and thiol redox integration and elucidates intracellular H₂O₂ dynamics during elicitor-induced oxidative burst in Arabidopsis // *New Phytologist*. 2019. V. 221(3). P. 1649-1664. doi: 10.1111/nph.15550
 18. Pecherina A., Grinberg M., Ageyeva M., Zanegina D., Akinchits E., Brilkina A., Vodeneev V. Salt-Induced Changes in Cytosolic pH and Photosynthesis in Tobacco and Potato Leaves // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. V. 24(1). 491. doi: 10.3390/ijms24010491
 19. Pecherina A., Grinberg M., Ageyeva M., Zdobnova T., Ladeynova M., Yudinsev A., Vodeneev V., Brilkina A. Whole-Plant Measure of Temperature-Induced Changes in the Cytosolic pH of Potato Plants Using Genetically Encoded Fluorescent Sensor Pt-GFP. *Agriculture*. 2021. V. 11(11). doi: 10.3390/agriculture11111131
 20. Ruts T., Matsubara S., Wiese-Klinkenberg A., Walter A. Diel patterns of leaf and root growth: endogenous rhythmicity or environmental response? // *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63(9). P. 3339-3351. doi: 10.1093/jxb/err334
 21. Sadoine M., Ishikawa Y., Kleist T.J., Wudick M.M., Nakamura M., Grossmann G., Frommer W.B., Ho C.H. Designs, applications, and limitations of genetically encoded fluorescent sensors to explore plant biology // *Plant Physiol.* 2021. V. 87(2). P. 485-503. doi: 10.1093/plphys/kiab353
 22. Salgotra R.K., Stewart C.N. Jr. Functional Markers for Precision Plant Breeding // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21(13). 4792. doi: 10.3390/ijms21134792
 23. Sewelam N., Kazan K., Schenk P.M. Global Plant Stress Signaling: Reactive Oxygen Species at the

- Cross-Road // *Frontiers in Plant Science*. 2016. V. 7. 187. doi: 10.3389/fpls.2016.00187
24. Sherstneva O., Khlopkov A., Gromova., Yudina L., Vetrova Y., Pecherina A., Kuznetsova D., Krutova E., Sukhov V., Vodeneev V. Analysis of chlorophyll fluorescence parameters as predictors of biomass accumulation and tolerance to heat and drought stress of wheat (*Triticum aestivum*) plants // *Functional Plant Biology*. V. 49(2). P. 155-169. doi: 10.1071/FP21209
25. Shi W., Wang L., Yao L., Hao W., Han C., Fan M., Wang W., Bai M.Y. Spatially patterned hydrogen peroxide orchestrates stomatal development in *Arabidopsis* // *Nature Communications*. 2022. V. 13. 5040. doi: 10.1038/s41467-022-32770-7
26. Sparks C.A., Jones H.D. Biolistics Transformation of Wheat // *Methods in Molecular Biology*. 2009. V. 478. P. 71-92. doi: 10.1007/978-1-59745-379-0_4
27. Yan Y., Ni M., Wang F., Yu Y., Gong X., Huang Y., Tao W., Li C., Wang F. Metal-Organic Framework-Based Biosensor for Detecting Hydrogen Peroxide in Plants through Color-to-Thermal Signal Conversion // *ACS Nano*. 2022. V. 16(9). P. 15175-15187. doi: 10.1021/acsnano.2c06481
28. Zhu X., Taylor A., Zhang S., Zhan, D., Feng Y., Liang G., Zhu J.K. Measuring Spatial and Temporal Ca²⁺ Signals in *Arabidopsis* Plants // *J. Vis. Exp.* 2014. V. 91. e51945. doi: 10.3791/51945
- References**
- Aadel H., Abdelwahd R., Udupa S.M., Diria G., Mouhtadi A. El, Ahansal K., Gaboun F., Douira A., Iraqi D. *Agrobacterium*-mediated Transformation of Mature Embryo Tissues of Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes. *Cereal Research Communications*. 2018. V. 46(1). P. 10-20. doi: 10.1556/0806.45.2017.055
 - Ageyeva M., Veselov A., Vodeneev V., Brilkina A. Cell-Type-Specific Length and Cytosolic pH Response of Superficial Cells of *Arabidopsis* Root to Chronic Salinity. *Plants*. 2022. V. 11(24). 3532. doi: 10.3390/plants11243532
 - Ageyeva M.N., Zdobnova T.A., Nazarova M.S., Raldugina G.N., Beliaev D.V., Vodeneev V.A., Brilkina A.A. The Morphological Parameters and Cytosolic pH of Cells of Root Zones in Tobacco Plants (*Nicotiana tabacum* L.): Nonlinear Effects of NaCl Concentrations. *Plants*. 2023. V. 12(21). 3708. doi: 10.3390/plants12213708
 - Alizadeh H., Mokhtari A., Samadi B.Y., Omidi M., Otroshy M., Moeini Z. Effect of plant growth regulator on direct shoot regeneration of wheat immature embryonic explants. *Eng. Biotech.* 2013. V. 1(3). P. 74-80.
 - Anders S., Cowling W., Pareek A., Gupta K. J., Singla-Pareek S. L., Foyer C. H. Gaining Acceptance of Novel Plant Breeding Technologies. *Trends in Plant Science*. 2021. V. 26(6). P. 575-587. doi: 10.1016/j.tplants.2021.03.004
 - Ding L.N., Li Y.T., Wu Y.Z., Li T., Geng R., Cao J., Zhang W., Tan X.L. Plant Disease Resistance-Related Signaling Pathways: Recent Progress and Future Prospects. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23(24). 16200. doi: 10.3390/ijms23241620
 - Gumerova G.R., Galimova A.A., Kuluev B.R. Kallusobrazovanie i organogenez mjagkoj pshenicy s ispol'zovaniem zrelyh zarodyshej v kachestve jeksplantov. *Trudy po Prikladnoj Botanike, Genetike i Selekcii*. 2023. T. 184(2). S. 19-28. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-19-28 [Callus formation and organogenesis of soft wheat using mature embryos as explants] (In Russian)
 - Hensel G. Genetic transformation of Triticeae cereals - Summary of almost three-decade's development. *Biotechnol Adv.* 2020. V. 40. 107484. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.107484
 - Kruglova N.N., Sel'dimirova O.A. Sistema «Zarodysh in planta–kallus in vitro»: citofiziologicheskie aspekty (na primere pshenicy). *Biomics*. 2020. V.12(2). P. 180-189. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-8 [Embryo in planta–callus in vitro": cytophysiological aspects (on the example of wheat)] (In Russian)
 - Kuluev B.R., Mihajlova E.V., Kuluev A.R., Galimova A.A., Zaikina E.A., Hlestkina E.K. redaktirovanie genomov predstavitelej triby pshenicevye s ispol'zovaniem sistemy CRISPR/Cas. *Molekuljarnaja biologija*. 2022. V. 56(6). P. 949-968. DOI: 10.31857/S0026898422060155 [Editing the genomes of representatives of the wheat tribe using the CRISPR/Cas] (In Russian)
 - Matkowski H., Daszkowska-Golec A. Update on stomata development and action under abiotic stress. *Front. Plant Sci.* 2023. V. 14. 1270180. doi: 10.3389/fpls.2023.1270180
 - Medvecka E., Harwood W.A. Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using mature embryos. *Agrobacterium protocols*. *New York: Springer*. 2015. V.1223. P. 199-209. doi: 10.1007/978-1-4939-1695-5_16
 - Miroshnichenko D.N., Sokolov R.N., Alikina O.V., Dolgov S.V. Comparative analysis of tissue culture efficiency of di-, tetra and hexaploid wheat breeds and species. *Biotechnology in Russia*. 2014. V. 30(1). P. 38-51.
 - Mitić N., Vinterhalter B., Ninkovic S., Dodig D. The procedure providing enhanced *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Biologia*. 2015 V. 69(12). P. 1668-1677. doi: 10.2478/s11756-014-0477-2
 - Mokhtari A., Alizadeh H., Samadi B.Y., Omidi M., Otroshy M., Moeini Z. Effect of plant growth regulator on direct shoot regeneration of wheat immature embryonic explants. *Eng. Biotech.* 2013. V. 1(3). P. 74-80. doi: 10.18005/JAEB0103004

16. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assay with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962. V. 15(3). P. 473-497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
17. Nietzel T., Elsasser M., Ruberti C., Steinbeck J., Ugalde J. M., Fuchs P., Wagner S., Ostermann L., Moseler A., Lemke P., Fricker M. D., Muller-Schussele S. J., Moerschbacher B. M., Costa A., Meyer A. J., Schwarzlander M. The fluorescent protein sensor roGFP2-Orp1 monitors *in vivo* H₂O₂ and thiol redox integration and elucidates intracellular H₂O₂ dynamics during elicitor-induced oxidative burst in Arabidopsis. *New Phytologist*. 2019. V. 221(3). P. 1649-1664. doi: 10.1111/nph.15550
18. Pecherina A., Grinberg M., Ageyeva M., Zanagina D., Akinchits E., Brilkina A., Vodeneev V. Salt-Induced Changes in Cytosolic pH and Photosynthesis in Tobacco and Potato Leaves. *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24(1). 491. doi: 10.3390/ijms24010491
19. Pecherina A., Grinberg M., Ageyeva M., Zdobnova T., Ladeynova M., Yudintsev A., Vodeneev V., Brilkina A. Whole-Plant Measure of Temperature-Induced Changes in the Cytosolic pH of Potato Plants Using Genetically Encoded Fluorescent Sensor Pt-GFP. *Agriculture*. 2021. V. 11(11). doi: 10.3390/agriculture11111131
20. Ruts T., Matsubara S., Wiese-Klinkenberg A., Walter A. Diel patterns of leaf and root growth: endogenous rhythmicity or environmental response? *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63(9). P. 3339-3351. doi: 10.1093/jxb/err334
21. Sadoine M., Ishikawa Y., Kleist T.J., Wudick M.M., Nakamura M., Grossmann G., Frommer W.B., Ho C.H. Designs, applications, and limitations of genetically encoded fluorescent sensors to explore plant biology. *Plant Physiol.* 2021. V. 87(2). P. 485-503. doi: 10.1093/plphys/kiab353
22. Salgotra R.K., Stewart C.N. Jr. Functional Markers for Precision Plant Breeding. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21(13). 4792. doi: 10.3390/ijms21134792
23. Sel'dimirova O.A., Galin I.R., Kruglova N.N., Veselov D.S. Jembrioidogennaja sposobnost' kallusov pshenicy i jachmenja in vitro opredeljaetsja balansom soderzhanija jendogennyh fitogormonov. *Biomics*. 2018. V. 10(4). P. 381-386. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-49 [The embryoidogenic ability of wheat and barley calluses in vitro is determined by the balance of endogenous phytohormones] (In Russian)
24. Sewelam N., Kazan K., Schenk P.M. Global Plant Stress Signaling: Reactive Oxygen Species at the Cross-Road. *Frontiers in Plant Science*. 2016. V. 7. 187. doi: 10.3389/fpls.2016.00187
25. Sherstneva O., Khlopkov A., Gromova., Yudina L., Vetrova Y., Pecherina A., Kuznetsova D., Krutova E., Sukhov V., Vodeneev V. Analysis of chlorophyll fluorescence parameters as predictors of biomass accumulation and tolerance to heat and drought stress of wheat (*Triticum aestivum*) plants. *Functional Plant Biology*. V. 49(2). P. 155-169. doi: 10.1071/FP21209
26. Shi W., Wang L., Yao L., Hao W., Han C., Fan M., Wang W., Bai M.Y. Spatially patterned hydrogen peroxide orchestrates stomatal development in Arabidopsis. *Nature Communications*. 2022. V. 13. 5040. doi: 10.1038/s41467-022-32770-7
27. Sparks C. A., Jones H. D. Biolistics Transformation of Wheat. *Methods in Molecular Biology*. 2009. V. 478 P. 71-92. doi: 10.1007/978-1-59745-379-0_4
28. Yan Y., Ni M., Wang F., Yu Y., Gong X., Huang Y., Tao W., Li C., Wang F. Metal-Organic Framework-Based Biosensor for Detecting Hydrogen Peroxide in Plants through Color-to-Thermal Signal Conversion. *ACS Nano*. 2022. V. 16(9). P. 15175-15187. doi: 10.1021/acsnano.2c06481
29. Zhu X., Taylor A., Zhang S., Zhan, D., Feng Y., Liang G., Zhu J.K. Measuring Spatial and Temporal Ca²⁺ Signals in Arabidopsis Plants. *J. Vis. Exp.* 2014. V. 91. e51945. doi: 10.3791/51945